


MULTIDRUG RESISTANCE INHIBITOR

Publication number: JP5070348 (A)

Also published as:

Publication date: 1993-03-23

 JP2514500 (B2)

Inventor(s): NAGATA KAZUHIRO; KOMANO TORU +

Applicant(s): KUREHA CHEMICAL IND CO LTD +

Classification:

- international: A61K31/35; A61K31/352; A61P35/00; A61P37/00; A61P43/00;
C07D311/30; C07D311/36; A61K31/35; A61K31/352;
A61P35/00; A61P37/00; A61P43/00; C07D311/00; (IPC1-
7): A61K31/35; C07D311/36

- European:

Application number: JP19910263234 19910914

Priority number(s): JP19910263234 19910914

Abstract of JP 5070348 (A)

PURPOSE:To obtain a multidrug resistance inhibitor, capable of inhibiting the multidrug resistance and maintaining anticancer action essentially possessed by an anticancer agent without exhibiting any toxicity as in the case of Ca²⁺ antagonistic agents which have hitherto been used as the multidrug resistance inhibitor. **CONSTITUTION:**A multidrug resistance inhibitor containing a flavonoid or its pharmaceutically permissible salt, especially quercetin as an active ingredient in an amount of 0.01-99wt.%, preferably 0.1-80wt.%. Since the above-mentioned active ingredient is capable of inhibiting and suppressing the action of substances for inducing or enhancing the transcription and expression of a multidrug resistance gene (MDR1), the anticancer action essentially possessed by an anticancer agent can be maintained or enhanced. Since the above-mentioned gene MDR1 expressed in tumorous cells having the multidrug resistance is inhibited at a transcription level, the inhibitor has no toxicity as in the case of Ca²⁺ antagonistic agents. Furthermore, the dose of the multidrug resistance inhibitor is normally about 1-500mg per adult expressed as the amount of the quercetin and orally or parenterally administered in about 1-4 divided portions a day.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-70348

(43)公開日 平成5年(1993)3月23日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/35	A B B	7252-4C		
	A D U			
	A G A			
// C 0 7 D 311/36		6701-4C		

審査請求 未請求 請求項の数2(全4頁)

<p>(21)出願番号 特願平3-263234</p> <p>(22)出願日 平成3年(1991)9月14日</p> <p>特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年3月15日 社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌65巻 03号講演要旨集」に発表</p>	<p>(71)出願人 000001100 呉羽化学工業株式会社 東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号</p> <p>(72)発明者 永田 和宏 京都府京都市左京区岩倉上蔵町189</p> <p>(72)発明者 駒野 徹 京都府京都市西京区大枝南福西町2丁目15 の14</p> <p>(74)代理人 弁理士 森田 憲一</p>
--	--

(54)【発明の名称】 多剤耐性抑制剤

(57)【要約】

【目的】 多剤耐性を抑制し、抗癌剤が本来的に有する
 抗癌作用を維持あるいは増強することのできる組成物を
 提供する。

【構成】 フラボノイド、特にケルセチンを有効成分と
 した。

【効果】 フラボノイド、特にケルセチンは、多剤耐性
 を有する腫瘍細胞に発現するMDR1遺伝子を転写レベ
 ルで直接阻害する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フラボノイドを含むことを特徴とする、多剤耐性抑制剤。

【請求項 2】 フラボノイドがケルセチンである請求項 1 記載の多剤耐性抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、フラボノイドを含む多剤耐性抑制剤に関する。本発明の多剤耐性抑制剤は、特に癌の化学療法分野で用いることができる。

【0002】

【従来の技術】 過去 30 年間、癌の化学療法は新しい抗癌剤を見出すことにより進歩してきた。抗癌剤の併用療法が確立することによって、ウィルムス腫瘍や白血病などの小児癌、婦人の絨毛癌などに対しては有効な治療法が見出され、これらは治癒可能な癌となっている。パキットリンパ腫、急性リンパ性白血病、ホジキン病などの患者も、かなりの高い割合で社会生活に復帰することができるようになった。このように化学療法に期待が寄せられている一方で、化学療法剤に殆ど反応しない肺癌や大腸癌などの固形癌も依然として存在する。更に、化学療法剤に反応する前記の癌においても、やがて抗癌剤が効かなくなる耐性化も問題となっている。癌の化学療法において最も重要な問題の一つは細胞毒性薬剤に対する耐性の進行である。

【0003】 抗癌剤に対する耐性としては、作用点や構造にあまり共通点が認められない各種の抗癌剤に対して同時に耐性を示す性質、即ち多剤耐性が知られている。この多剤耐性を担う遺伝子はヒト培養細胞から既に単離されており、MDR1 (multidrug-resistance) 遺伝子と命名されている。この多剤耐性遺伝子MDR1 がコードしているヒト膜タンパク質 (P-糖タンパク質) はアミノ酸 1,280 個からなるペプチドであり、エネルギーに依存して抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働いている。

【0004】 P-糖タンパク質は、多くの天然物由来の細胞毒性薬剤、例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、アクチノマイシンD、グラミジシン、ドキシフルビン、コルヒチン、エポキシド (VP-16) 及びデニポシド (VM-26) に対する耐性にも関係している。この多剤耐性を克服するために、Ca²⁺ 拮抗薬であるベラパミールなどの薬剤を用い、P-糖タンパク質による細胞内薬物の排出を阻害することにより、耐性を減少させるという試みがなされている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、これら Ca²⁺ 拮抗薬は副作用が多い。即ち、血管拡張作用が強いので、降圧に伴って交感神経系の活性が高まり、頭痛、動悸又は顔面紅潮などの副作用がより易く、下肢の浮腫をきたすこともしばしばある。従って、ベラパミ

2

ールなどの Ca²⁺ 拮抗薬の投与は、低血圧などによりショックを誘発することがあるので危険である。

【0006】 本発明者は、多剤耐性の発現を遺伝子レベルで制御することのできる物質について探索した結果、意外にもフラボノイドにはヒト多剤耐性遺伝子MDR1 の発現、誘導を抑える作用があることを見出した。本発明はこうした知見に基づくものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 従って、本発明は、フラボノイドを含むことを特徴とする、多剤耐性抑制剤に関する。本発明の多剤耐性抑制剤で有効成分として用いるフラボノイドとしては、例えば、カルコン類、フラバノン類、フラボラン類、フラボノール類、フラバノール類、フラバノール類、イソフラボン類及び/又はアントシアニン類に属する各種の化合物を挙げることができるが、特にケルセチン (即ち、2— (3, 4—ジヒドロキシフェニル) —3, 5—トリヒドロキシ—4H—1—ベンゾピラン—4—オン) が好ましい。

【0008】 本発明の多剤耐性抑制剤を用いる場合の投与量は、癌の種類、患者の症状の程度などにより異なり、特に制限はないが、ケルセチン量として通常成人 1 人当たり 1~500mg 程度を 1 日 1~4 回程度にわけて、経口的に又は非経口的に投与する。投与剤型としては、例えば、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、注射剤などを挙げることができる。製剤化の際には、通常の製剤剤型を用いて、常法によって製造することができる。例えばケルセチン 1w/w % と乳糖 99w/w % を混合して充填したカプセル剤などである。本発明の多剤耐性抑制剤は、フラボノイド又はその医薬上許容される塩を 0.01~99 重量 %、好ましくは 0.1~80 重量 % の量で含有する。なお、ケルセチンの急性毒性 (LD₅₀) をマウスの経口投与によって測定したところ、160mg/kg であった。培地中のケルセチンの濃度としては 20ないし 200µM が望ましい。

【0009】

【作用】 多剤耐性遺伝子MDR1 の転写及び発現は、例えば熱や亜硫酸によって増強される。多剤耐性遺伝子MDR1 の転写及び発現が増強されると、多剤耐性遺伝子MDR1 の産物であるP-糖タンパク質が多量に産生され、P-糖タンパク質が細胞内の抗癌剤などを細胞外へ排出するので、多剤耐性が現れることになる。しかしながら、本発明の多剤耐性抑制剤において有効成分として用いるフラボノイド、特にケルセチンは、多剤耐性遺伝子MDR1 の転写及び発現を誘導又は増強する物質の作用を阻害し、抑制することができる。従って、本発明の多剤耐性抑制剤は、抗癌剤が本来的に有する抗癌作用を維持あるいは増強することができる。また、前記のフラボノイド、特にケルセチンは、多剤耐性を有する腫瘍細胞に発現する多剤耐性遺伝子MDR1 を転写レベルで直接阻害するので、従来から多剤耐性抑制に用いられてき

たCa²⁺拮抗薬のような毒性がない。

【0010】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0011】実施例1：ケルセチンによるMDR1遺伝子転写抑制作用

ヒト肝癌由来のHepG2細胞(ATCC-HB8065)を10%ウシ胎児血清含有ダルベッコ・モディファイド・イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)中で培養した。この細胞のMDR1遺伝子の発現に対するケルセチンの効果を調べるため、MDR1遺伝子のプロモーターの下流にCAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)遺伝子を連結し、CATアッセイ法

「ラボマニュアル 遺伝子工学 増補版」、第30章、1990年、丸善(株)により解析した。具体的には、MDR1下流プロモーターの制御下にCAT遺伝子を含んでいるプラスミドpMPCAT(MDR1のプロモーター領域(Ueda, K., et al., Jpn. J. Cancer Res., 80, 1127-1132, (1989) 参照)をエクソヌクレアーゼIII(タカラカタログ番号2170)とマンギビンヌクレアーゼ(タカラカタログ番号2420)により切出した後、プラスミドpSV0CAT(Araki, E., et al., Nucleic Acids Res., (1988), 16, 1627参照)につなぎかえたプラスミドである。対照としてTKプロモーター(MDR1プロモーター不存在)の下流にCAT遺伝子と連結したプラスミドpBLCAT2(Luckow, B., et al., Nucleic Acids Res., 15, 5490 (1987) 参照)を用いた。これらの各プラスミドDNA 10 µg * 30

処理	pMPCAT (MDR1プロモーター)	pBLCAT2 (TKプロモーター)
コントロール	100	100
亜硫酸ナトリウム	208	106
ケルセチン	114	113
ケルセチン+亜硫酸ナトリウム	94	106

【0014】実施例2：ケルセチンによるP-糖タンパク質合成抑制作用

P-糖タンパク質合成に対する影響を免疫沈降法によって調べた。実施例1で用いたHepG2細胞を実施例1と同様の条件下で培養した後、これらの細胞を4群に分け、以下の各種の処理を行なった。即ち、(1)薬物処理を行わずそのまま培養(表2の「コントロール」欄)、(2)亜硫酸ナトリウム(100 µM)処理を4時間実施(表2の「亜硫酸ナトリウム」欄)、(3)ケルセチン(ナカライテスク製：100 µM)処理を4時間実施(表2の「ケルセチン」欄)、及び(4)前項(3)のケルセチン処理を4時間実施した後、更にケルセチンを入れたまま、亜硫酸ナトリウム(100 µM)

*を、内部コントロールプラスミドとしてのpaci-β-gal(ニワトリβ-アクトチンプロモーターの制御下にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を有する)(理化学研究所分子遺伝学教室石井俊輔氏より入手)5 µgと共に、リン酸カルシウム共沈法によって前記細胞に導入した。DNA導入とグリセロールショックが成る種のストレスを引き起こすので、導入処理から4日後の細胞を使用した。CAT酵素活性を測定する前にこれらの細胞を4群に分け、以下の各種の処理を行なった。即ち、(1)薬物処理を行わずそのまま培養(表1の「コントロール」欄)、(2)亜硫酸ナトリウム(100 µM)処理を4時間実施(表1の「亜硫酸ナトリウム」欄)、(3)ケルセチン(ナカライテスク製：100 µM)処理を4時間実施(表1の「ケルセチン」欄)、及び(4)前項(3)のケルセチン処理を4時間実施した後、更にケルセチンを入れたまま、亜硫酸ナトリウム(100 µM)処理を4時間実施(表1の「ケルセチン+亜硫酸ナトリウム」欄)。

【0012】亜硫酸ナトリウムはリン酸緩衝液(PBS)に、ケルセチンは10 mMの濃度でジメチルスルホキシド(DMSO)にそれぞれ溶解しておき、培地中で所定の濃度となるように培地に添加した。続いて、(2)～(4)についてはケルセチンを含む新鮮な培養液に交換してから更に2時間培養して細胞を回復させた。同じβ-ガラクトシダーゼ活性を示す細胞抽出物をCATアッセイに用いた。以下の表1に、CATアッセイの5回の平均値を示す(コントロールを100とした相対値)。

【0013】

【表1】

処理を4時間実施(表2の「ケルセチン+亜硫酸ナトリウム」欄)。

【0015】亜硫酸ナトリウムはリン酸緩衝液(PBS)に、ケルセチンは10 mMの濃度でジメチルスルホキシド(DMSO)にそれぞれ溶解しておき、培地中で所定の濃度となるように培地に添加した。続いて、(2)～(4)についてはケルセチンを含む新鮮な培養液に交換してから更に2時間培養して細胞を回復させた。次に、³⁵Sメチオニンで細胞を1時間処理して標識化した。細胞の破砕物とP-糖タンパク質に対するモノクローナル抗体C-219(セントコア社)を4℃で1時間混合しプロテインA-セファロースで免疫複合体を沈澱させた。沈澱物を7%ナトリウムデシルサルフェート-ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)で電気

泳動した後、各泳動バンドの濃さをデンストメーターで測定した。各処理に対する P-糖タンパク質の産生量を表 2 に示す (コントロールを 1.0 とした相対値)。 * 【0016】

処理	P-糖タンパク質の産生量
コントロール	1.0
亜硫酸ナトリウム	2.2
ケルセチン	<1.0
ケルセチン+亜硫酸ナトリウム	<1.0

【0017】 以上のように、ケルセチンは、多剤耐性タンパク質をコードする遺伝子 MDR1 の発現増強を転写レベルで阻害し P-糖タンパク質の生合成を阻害することが明らかである。

【0018】

【発明の効果】 本発明の多剤耐性抑制剤において有効成

分として用いるフラボノイド、特にケルセチンは、多剤耐性を有する腫瘍細胞に発現する MDR1 遺伝子を転写レベルで直接阻害するので、従来、多剤耐性の克服に試みられてきた Ca^{2+} 拮抗剤に見られた毒性はない。従って、本発明は新規な多剤耐性克服手段を提供するものである。